

機関番号：14301
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2008～2010
課題番号：20689023
研究課題名(和文) アルツハイマー病における β アミロイドおよびタウの分子イメージング
プローブの開発
研究課題名(英文) Development of molecular imaging probes for β -amyloid and tau in
Alzheimer's disease
研究代表者
小野 正博 (ONO MASAHIRO)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：80336180

研究成果の概要(和文)：近年、急速な高齢化に伴い、アルツハイマー病(AD)患者の増加が社会問題のひとつになっている。しかし、ADの確定診断は患者剖検脳の病理学的所見に委ねられており、重篤な脳障害が生じる前の早期段階でADを診断することは困難である。AD発症までの特徴的な脳病変として、アミロイド β タンパク質(A β)凝集体を主成分とする老人斑の沈着と過剰リン酸化タウタンパク質凝集体を主成分とする神経原線維変化が知られている。本研究では、AD脳内におけるA β およびタウを標的とした数種類のPET/SPECTイメージングプローブの開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease of the brain associated with irreversible cognitive decline, memory impairment, and behavioral changes. Postmortem brains of AD patients reveal neuropathologic features: the presence of senile plaques (SPs) and neurofibrillary tangles (NFTs), which contain β -amyloid proteins and highly phosphorylated tau proteins. In the present study, we successfully designed and synthesized several PET/SPECT imaging probes for *in vivo* detection of SPs and NFTs, and evaluated their utility as molecular imaging probes for SPs and NFTs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
総計	18,900,000	5,670,000	24,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射性医薬品・造影剤

1. 研究開始当初の背景

近年、急速な高齢化に伴い、アルツハイマー病(AD)患者の増加が社会問題のひとつになっている。しかし、ADの確定診断は患者剖検脳の病理学的所見(老人斑と神経原線維変化)に委ねられており、重篤な脳障害が生じる前の早期段階でADを診断することは困難となっている。AD発症までの最も初期段階の特徴的な脳病変として、アミロイドβ蛋白(Aβ)の沈着が知られており、Aβの早期検出はADの早期診断につながると考えられる。そこで申請者は、Aβに選択的結合性を有する single photon emission tomography (SPECT)および positron emission tomography (PET)用放射性プローブ(アミロイドイメージングプローブ)の開発を行ってきた。

現在までに、世界各国の研究グループによって、多くのアミロイドイメージングプローブが報告されてきた。しかし、いずれもアミロイドの蛍光染色試薬であるコンゴーレッド(CR)およびチオフラビン T (ThT)の化学構造を基に分子設計された化合物であり、インビトロにおいてAβに高い結合性を示すものの、血液脳関門の透過性が低いこと、脳内でのAβへの特異的結合性が低いなどの問題を有した。申請者は、2001年から、当時アミロイドプローブの先駆的研究を行っていたペンシルバニア大学 Hank F. Kung 教授の研究室において、CRおよびThTを基本骨格とする種々化合物の開発研究を行った。この開発研究で培った経験から、より有効なアミロイドイメージングプローブの開発には、CRおよびThT以外の基本骨格を持つ化合物の探索が必要であると考えた。こうした背景をふまえ、申請者は、アミロイドイメージングプローブとして機能するCR、ThTとは別の分子骨格の探索研究を独自に行ってきた。その中で、フラボノイド化合物の基本骨格をアミロイドイメージングプローブとして応用することを考案した。種々の置換基と放射性ヨウ素を導入したフラボン、カルコン、オーロン誘導体を開発し、Aβを用いたインビトロ結合実験、正常マウス体内放射能分布実験による脳移行性とクリアランスについての検討を行った。その結果、インビトロ結合実験において、これら誘導体はAβに高い結合親和

性を有すること、正常マウス脳への高い移行性を示すことが明らかとなった。さらに投与早期に脳へ移行した後、Aβの存在しない正常マウス脳から速やかな消失が観察され、既報のプローブ化合物に比べ、アミロイドイメージングプローブとして優れた性質を示すことを見出した。また、AD患者の脳切片を用いた検討の結果、びまん性老人斑を含む老人斑アミロイドに特異的結合性を有することが明らかとなった。ADにおける老人斑の主成分であるAβは同病が発症するかなり以前に蓄積が始まると考えられており、この初期の蓄積像がびまん性老人斑であると考えられている。したがって、びまん性老人斑に結合性を有するフラボノイド誘導体は、既報のプローブに比べ、より早期にAβの検出を可能にすることが期待される。

一方、現在のアミロイドイメージング研究は、上述のようにAβの異常がAD発症の引き金であるとするアミロイド仮説に基づくものが主流であるが、近年、前頭側頭葉型認知症(frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: FTDP-17)ではタウ遺伝子の変異により神経原線維の出現が促進され認知症状が出現すること、タウタンパク質が脳内で凝集・蓄積するだけで神経細胞に異常が生ずることなどが明らかとなってきており、タウの異常凝集とAD発症との関係についても大きな注目が集まっている。そこで本研究では、Aβイメージングプローブの開発と並行し、タウイメージングプローブの開発を計画した。タウ結合性プローブを用いた生体タウイメージングは、ADにおける神経原線維変化と神経機能低下との関連を解明できるだけではなく、Aβイメージングプローブと組み合わせて診断することにより、ADとタウ病変陽性の非AD型認知症とを鑑別診断することが可能となる。さらに、タウの異常を抑止する治療薬の開発、その薬剤の治療効果を評価する上でも極めて有用性が高いと考えられる。AD脳におけるタウは、Aβ同様、βシートに富んだ構造をとり、凝集・繊維化し、脳内に沈着することから、申請者が開発を進めてきた、βシート構造を認識するAβイメージングプローブが、タウ

イメージングプローブとして応用できる可能性も有している。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが独自に開発した、フラボノイド化合物などを基本骨格に利用して、さらに高性能な A β イメージングプローブの開発を推進するとともに、A β 結合性および非結合性プローブの中から、タウイメージングに応用可能なプローブの探索研究を行い、研究期間内に A β とタウ、それぞれに特異性の高い分子イメージングプローブの開発を目標とする。

3. 研究の方法

(1) 分子プローブ候補化合物の合成

フラボノイド化合物(フラボン、カルコン、オーロン) およびその類縁化合物(スチリルクロモン、フェニルクマリン)(いずれも特許成立、特許出願済、研究業績欄)等に、フッ素、ヨウ素および種々の置換基(ジメチルアミノ基、メチルアミノ基、メトキシ基、ヒドロキシル基など)を導入した化合物を合成する。¹⁸F および ¹²⁵I 標識のため、それぞれの標識前駆体である、トシル体およびトリブチルスズ体の合成も行う。また、^{99m}Tc 標識プローブに関しては、フラボノイド化合物の母体骨格に ^{99m}Tc 標識のための錯体形成部位を導入する必要がある。脳移行性を考慮すると、電気的に中性であり、かつ、適度な脂溶性を有する配位部位が適当であることから、窒素と硫黄原子から構成される N2S2 型あるいはトリカルボニル錯体をフラボノイド化合物に導入した化合物を合成する。

(2) アミロイド β 蛋白との結合性の検討

(1)で合成した種々の化合物に関して、アミロイド β 蛋白(A β 40、A β 42)を用いたインビトロ結合実験を行い、アミロイド凝集体に対する結合親和性を検討する。実際は、まず解離定数(K_d)を算出し、脳内アミロイドの画像化に十分な結合性を有すると考えられる、 K_d が 20 nM 以下の化合物の選出を行う。^{99m}Tc 標識プローブは、Tc に安定同位体が存在しないため、 K_d の算出が難しいことから、 K_d が既知の放射性ヨウ素標識化合物をリファレンスとして用いる。 K_d 値が 20 nM 以下の化合物に関しては、(4)の正常マウスを用いた体内放射能分布実験に供する。

(3) タウ蛋白との結合性の検討

(1)で合成した種々の化合物に関して、タウ蛋白を用いたインビトロ結合実験を行い、タウ凝集体に対する結合親和性を検討する。

(4) 正常マウスにおける脳移行性とクリアランスの検討

(2)(3)の検討において、A β あるいはタウ蛋白に高い結合性を示した化合物に関して、正常マウスに投与後の体内動態を検討し、化合物の脳移行性とクリアランスを評価する。脳内アミロイドの画像化には、投与初期の脳への高い移行性と、A β およびタウ凝集体以外の部位からの速やかなクリアランスが必要である。正常マウスには、A β およびタウ凝集体が存在しないため、本検討においては、投与初期の高い脳移行性とその後速やかなクリアランスを示す化合物が理想である。従って、投与2分後の脳への移行性が脳1グラムあたり投与量の1%以上、投与30分後に脳に残存する放射能が投与2分後の値の70%以下である化合物の選別を行う。

(5) A β 過剰発現トランスジェニック(Tg)マウスを病態モデル動物に用いる検討

(4)までの検討より、A β 凝集体への高い結合親和性と良好なマウス体内放射能動態を示したプローブに関して、その老人斑アミロイドイメージングプローブとしての有用性を評価する。病態モデルマウスには、A β を過剰発現させた Tg マウスを米国タコニック社より購入、飼育後使用する。プローブを Tg マウスに投与後、マウスを屠殺、脳を摘出し、凍結マイクロトームにより、脳切片を作製し、その脳切片のオートラジオグラフィ法による放射能分布と、抗 A β 抗体を用いた免疫染色、チオフラビン S などのアミロイド蛍光染色剤で処理後の蛍光分布との比較検討より、プローブの A β への結合性についての評価を行う。

(6) タウ過剰発現 Tg マウスを病態モデル動物に用いる検討

(4)までの検討より、タウ凝集体への高い結合親和性と良好なマウス体内放射能動態を示したプローブに関して、そのタウイメージングプローブとしての有用性を評価する。病態モデルマウスには、タウを過剰発現させた Tg マウスをタコニック社より購入、飼育後使用する。

(7) A β とタウへの特異的結合性に関する検討

(5)(6)の検討で選定された、A β あるいはタウに結合性の高い化合物に関して、同一個体に A β とタウを過剰発現させた Tg マウスを用いた検討を行う。本検討に用いる Tg マウスはタコニック社より購入し、実験手法は(5)(6)と同様に行う。

4. 研究成果

本研究では、申請者らが独自に開発した、フラボノイド化合物などを基本骨格に利用して、さらに高性能な A β イメージングプローブの開発を推進するとともに、A β 結合

性および非結合性プローブの中から、タウイメージングに応用可能なプローブの探索研究を行い、研究期間内に A β とタウ、それぞれに特異性の高い分子イメージングプローブの開発を目標とした。申請者は、アミロイドイメージングプローブとして機能する CR、ThT とは別の分子骨格の探索研究を独自に行ってきた。その中で、フラボノイド化合物の基本骨格をアミロイドイメージングプローブとして応用することを考案した。種々の置換基と放射性ヨウ素を導入したフラボン、カルコン、オーロン誘導体を開発し、A β を用いたインビトロ結合実験、正常マウス体内放射能分布実験による脳移行性とクリアランスについての検討を行った。その結果、インビトロ結合実験において、これら誘導体は A β に高い結合親和性を有すること、正常マウス脳への高い移行性を示すことが明らかとなった。さらに投与早期に脳へ移行した後、A β の存在しない正常マウス脳から速やかな消失が観察され、既報のプローブ化合物に比べ、アミロイドイメージングプローブとして優れた性質を示すことを見出した。まず、これらフラボノイド化合物のアミロイドイメージングプローブとしての最適化の検討を行い、いくつかの高性能プローブの開発に成功した。

アルツハイマー病における脳内病理学的変化として、A β を主成分とする老人斑とは別に、異常リン酸化されたタウを主成分とする神経原線維変化(NFT)が知られている。NFTは老人斑の沈着に比べ、その発現量は臨床症状に高い相関性を示すことが報告されており、タウのイメージングはADの病状診断、治療効果判定に有用であると考えられる。本研究では、タウイメージングプローブの開発を目的とし、タウ凝集阻害剤であるローダニン(RH)及びチオヒダントイン(TH)を母核とする数種の¹²⁵I標識化合物を合成し、その有用性を評価した。種々のRHおよびTH誘導体を合成し、チオフラビン S (ThS)をリガンドとするタウ凝集体への競合阻害実験を行った。¹²⁵I標識体はスズ標識前駆体からのスズ-ヨウ素交換反応により合成した。¹²⁵I標識体のタウ凝集体への結合性をサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)により検討した。さらに正常マウス体内放射能分布実験を行い、脳への移行性および脳からの消失に関する評価を行った。ThSとの競合阻害実験において、RHおよびTH誘導体はThSのタウ凝集体への結合を阻害したことから、本誘導体のタウへの結合性が示唆された。¹²⁵I標識体は、放射化学的収率 8-22%、放射化学的純度 90%以上で得た。¹²⁵I標識体とタウ凝集体との反応液を SEC により分析した結果、¹²⁵I

標識体は非凝集タウへの結合に比較して、タウ凝集体への高い結合性を示した。この結果はThSを用いた競合阻害実験の結果を支持するとともに、本誘導体の凝集体特異的な結合性を示唆するものと考えられた。また体内放射能分布実験の結果、数種の化合物は脳への移行性と脳からの速やかな消失を示した。以上より、RHおよびTH誘導体はタウイメージングプローブとして基礎的性質を有することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① Ono M, Saji H. SPECT imaging agents for detecting cerebral β -amyloid plaques. *International Journal of Molecular Imaging*, in press. (査読有)
- ② Matsumura K, Ono M, Hayashi S, Kimura H, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Mori H, Saji H. Phenyl diazenyl benzothiazole derivatives as probes for in vivo imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *Medicinal Chemistry Communications*, in press. (査読有)
- ③ Cui MC, Ono M, Kimura H, Liu BL, Saji H. Synthesis and structure-affinity relationships of novel dibenzylideneacetone derivatives as probes for β -amyloid plaques. *Journal of Medicinal Chemistry*, in press. (査読有)
- ④ Ono M, Cheng Y, Kimura H, Cui MC, Kagawa S, Nishii R, Saji H. Novel ¹⁸F-labeled benzofuran derivatives with improved properties for PET imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Journal of Medicinal Chemistry*, in press. (査読有)
- ⑤ Ono M, Hayashi S, Matsumura K, Kimura H, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Mori H, Saji H. Rhodanine and thiohydantoin derivatives for detecting tau pathology in Alzheimer's brains. *ACS Chemical Neuroscience*, in press. (査読有)
- ⑥ Cui M, Ono M, Kimura H, Kawashima H, Liu BL, Saji H. Radioiodinated Benzimidazole Derivatives as Single Photon Emission Computed

- Tomography Probes for Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease, Nuclear Medicine and Biology, in press. (査読有)
- ⑦ Ono M, Watanabe H, Watanabe R, Haratake M, Nakayama M, Saji H. Diphenylpropynone derivatives as probes for imaging β -amyloid plaques. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 2011, 117-120. (査読有)
- ⑧ Cui M, Ono M, Kimura H, Liu BL, Saji H, Synthesis and biological evaluation of indole-chalcone derivatives as β -amyloid imaging probe. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 2011, 980-982. (査読有)
- ⑨ Ono M, Ikeoka R, Watanabe H, Kimura H, Fuchigami T, Haratake M, Saji H, Nakayama M. $^{99m}\text{Tc}/\text{Re}$ complexes based on flavone and aurone as SPECT probes for imaging cerebral β -amyloid plaques. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 2010, 5742-5748. (査読有)
- ⑩ Ono M, Fuchi Y, Fuchigami T, Kobashi N, Kimura H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Novel benzofurans with ^{99m}Tc complexes as probes for imaging cerebral β -amyloid plaques using single photon emission computed tomography. *ACS Medicinal Chemistry*, 1, 2010, 443-447. (査読有)
- ⑪ Cheng Y, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii R, Kawashima H, Saji H. Fluorinated benzofuran derivatives for PET imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease brains. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1, 2010, 321-325. (査読有)
- ⑫ Ono M, Ikeoka R, Watanabe H, Kimura H, Fuchigami T, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Synthesis and evaluation of novel chalcone derivatives with $^{99m}\text{Tc}/\text{Re}$ complexes as potential probes for detection of β -amyloid plaques. *ACS Chemical Neuroscience*, 1, 2010, 598-607. (査読有)
- ⑬ Watanabe H, Ono M, Haratake M, Kobashi N, Saji H, Nakayama M. Synthesis and characterization of novel phenylindoles as potential probes for imaging of β -amyloid plaques in the brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 2010, 4740-4746. (査読有)
- ⑭ Ono M. Development of positron-emission tomography /single-photon emission computed tomography imaging probes for in vivo detection of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 57, 1029-1039 (2009). (査読有)
- ⑮ Ono M. Molecular imaging by PET/SPECT. *Yakugaku Zasshi*, 129, 279-287 (2009). (査読有)
- ⑯ Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Kawai T, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. ^{18}F -labeled flavones for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 2069-2076 (2009). (査読有)
- ⑰ Watanabe H, Ono M, Ikeoka R, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Synthesis and biological evaluation of radioiodinated 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazoles for detecting β -amyloid plaques in the brain. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 6402-6406 (2009). (査読有)
- ⑱ Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 6394-6401 (2009). (査読有)
- [学会発表] (計 8 件)
- ① 松村憲志、小野正博、林瞬、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、タウ結合性化合物の探索とその分子イメージングプローブへの応用、第 131 回日本薬学会、2011 年 3 月 30 日、静岡
- ② 程妍、小野正博、木村寛之、上田真史、

- 中本裕士、富樫かおり、中山守雄、佐治英郎、Aurone を母核とする新規 ^{18}F 標識 A β イメージングプローブの開発、第 131 回日本薬学会、2011 年 3 月 30 日、静岡
- ③ 松村憲志、小野正博、林瞬、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、タウ結合性化合物の探索とその分子イメージングプローブへの応用、第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2010 年 11 月 17 日、京都
- ④ 程妍、小野正博、木村寛之、加川信也、西井龍一、佐治英郎、 ^{18}F Labeled Benzofuran Derivatives as PET Probes for Detection of β -Amyloid Plaques、第 50 回日本核医学会、2010 年 11 月 11 日、大宮
- ⑤ 松村憲志、小野正博、林瞬、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、アルツハイマー病診断を目的とした新規タウイメージングプローブの開発、第 50 回日本核医学会、2010 年 11 月 11 日、大宮
- ⑥ Yan Cheng, Masahiro Ono, Hiroyuki Kimura, Shinya Kagawa, Ryuichi Nishii, Hidekazu Kawashima, Hideo Saji, Fluorinated Benzofuran Derivatives for PET Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Brains, World Molecular Imaging Congress、2010 年 9 月 9 日、京都
- ⑦ 小野正博、 β アミロイドの PET/SPECT 分子イメージングプローブの開発（次世代の薬効評価系を目指した新しい光学技術）、日本薬理学会、2010 年 3 月 18 日、大阪
- ⑧ 小野正博、アミロイドイメージングの基礎、第 49 回日本核医学会、2009 年 10 月 2 日、旭川

〔産業財産権〕

○出願状況（計 3 件）

名称：コンフォメーション病診断用組成物
発明者：佐治英郎、小野正博
権利者：京都大学
種類：特許
番号：特願 2009-107457
出願年月日：2009 年 4 月 27 日
国内

名称：コンフォメーション病診断用組成物
発明者：佐治英郎、小野正博
権利者：京都大学
種類：特許
番号：特願 2009-222156
出願年月日：2009 年 9 月 28 日
国内

名称：コンフォメーション病診断用組成物
発明者：佐治英郎、小野正博
権利者：京都大学
種類：特許
番号：PCT/JP2010/056538
出願年月日：2010 年 4 月 12 日
国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/byotai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 正博 (ONO MASAHIRO)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：80336180